

Assembly for automatic bio tests

Patent Number: DE19845883
Publication date: 1999-05-27
Inventor(s): VANDENHIRTZ JOERG (DE); KUECHEN JOERG (DE); EBERIUS MATTHIAS (DE); VANDENHIRTZ DIRK (DE)
Applicant(s): LEMNATEC GMBH LABOR FUER ELEKT (DE)
Requested Patent: ☐ DE19845883
Application Number: DE19981045883 19981006
Priority Number(s): DE19981045883 19981006; DE19971045518 19971015; DE19971045519 19971015
IPC Classification: G01N33/483; G06T7/00; A01C1/02
EC Classification: G01N33/483, A01C1/00
Equivalents:

Abstract

The apparatus for bio tests has an automatic image evaluation of biological samples in sample dishes, with and without the effects of phytotoxic substances in various matrices. An optical system for the images uses a digital charge coupled device (CCD) camera, and the samples are illuminated by light on or through them, with a glass disk of a high polarity matrix if required. The data for reduction and evaluation are passed to an image analysis system. The assembly has a system to discriminate between sample components such as seed husks, roots, shoots, hairs and the like, where surfaces can be shrouded. The operation takes into account their length and width, and shadow surfaces in a quantitative measurement. The same sample can be measured repeatedly to show changes in the sample between the periodic measurements. A barcode for the sample is within the camera field, to relate the measurements and their timings to the sample, together with test sets where the sample dishes are placed by the computer for randomized test runs. The system is calibrated automatically, using a test body of known geometry and color, so that the sample data can be computed in absolute values. The test body has a barcode for calibration. The illumination can be set for evaluation in dark surroundings, using a wavelength which does not affect the plants, but is visible to the camera, so that the image analysis can be carried out in a light which is not in the visible spectrum. The illumination is pref. in the infra red range. The color camera has a filter according to the colors required for separate register and evaluation of the samples. The system compares registered data with stored comparative data. The camera and the evaluation systems are in separate locations, to give a central evaluation station. The camera and the sample dishes are moved in relation to each other, so that the camera can take focused pictures of the samples. The evaluation system can determine the effects of environmental chemicals through the color and structure patterns of the test plants, and also establish the seeds from movement patterns, color and shape categories also after growth. Objects which are below the resolution threshold of the camera, ≤ 1 mm, can be reproduced true to the original. The camera and the evaluation system can determine the metabolism rate of the plants, through a filter system. Specific optical filters are fitted for the illumination and the camera, to measure and quantify the fluorescence of the plants.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

01P21603



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Off nl ungungsschrift
⑩ DE 198 45 883 A 1

⑤ Int. Cl.⁶:
G 01 N 33/483
G 06 T 7/00
A 01 C 1/02

⑳ Aktenzeichen: 198 45 883.5
㉒ Anmeldetag: 6. 10. 98
㉔ Offenlegungstag: 27. 5. 99

DE 198 45 883 A 1

⑥⑥ Innere Priorität:

197 45 518. 2 15. 10. 97
197 45 519. 0 15. 10. 97

⑦① Anmelder:

LemnaTec GmbH Labor für elektronische und
maschinelle Naturanalytik, 52146 Würselen, DE

⑦④ Vertreter:

Wagner, M., Dipl.-Ing., Pat.-Anw., 52068 Aachen

⑦② Erfinder:

Vandenhirtz, Dirk, 52064 Aachen, DE; Eberius,
Matthias, 52074 Aachen, DE; Vandenhirtz, Jörg,
52064 Aachen, DE; Küchen, Jörg, 52146 Würselen,
DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Vorrichtung zur Durchführung von Biotests

⑤⑦ Es ist eine Vorrichtung zur Durchführung von Biotests
offenbart, die gekennzeichnet ist durch Mittel zur automa-
tischen bildanalytischen Auswertung von in Probenschä-
len angeordneten biologischen Proben mit und ohne Ein-
fluß potentiell phytotoxischer Substanzen in verschiede-
nen Matrices, mit einer optischen Aufnahmeeinrichtung,
die die Probenschale mit Auf- oder Durchlicht beleuchtet,
die Proben gegebenenfalls mit einer Glasscheibe oder ei-
ner hoch polaren Matrix planarisiert, mit einer digitalen
(CCD) Kamera aufnimmt und die Daten zur Reduktion und
Auswertung an ein Bildanalysesystem weitergibt.
Hierdurch wird eine einfach durchzuführende, objektivier-
bare und objekterhaltende Möglichkeit zur Durchführung
und Auswertung von Biotests geschaffen.

DE 198 45 883 A 1

Biotests sind bekannt. So werden z. B. biologische Kurzzeittests zur Keimung und zum weiteren Wachstum von Pflanzen insbesondere der Wurzel und des Sprosses bis zum Keimblattstadium durchgeführt.

Derartige Biotests werden je nach Fragestellung zur Bestimmung der Vitalität von Saatgut, besonders aber zum integralen Aufspüren von phyto/pflanzen-toxischen Wirkungen von Reinstoffen, Stoffgemischen und Umweltpollen (Wasser, Wasserkonzentrate, Boden, Sediment, Boden- und Sedimenteluat und -extrakte, Feststoffe) eingesetzt.

Sie ermöglichen die integrale Bewertung von in die Umwelt einzubringenden oder dort vorkommenden Stoffen hinsichtlich möglicher Gefährdungspotentiale z. B. durch Schadstoffeintrag aus der Luft und dem Regen in Waldgebieten. Für potentielle Schadstoffgemische mit komplexer, chemisch-analytisch gar nicht umfassend analysierbarer Zusammensetzung – z. B. Abwasser-, Deponiesickerwasserströme, Bodenextrakte besonders aus Altlasten und deren biologische Sanierungsprodukte – Verbrennungsprodukte (Abgase) aus der Chemischen Industrie, der Energieerzeuger und dem Straßenverkehr sind integrale Wirkungstests zur ökotoxikologischen Bewertung unverzichtbar.

Biotests können besonders bei modernen Pflanzenschutzmitteln (hoher Wirksamkeit bei geringer Aufwandmenge) in Ergänzung und Konkurrenz zur oft schwierigen chemischen Analytik treten.

Das Wachstum von terrestrischen oder aquatischen Gefäßpflanzen ist die lebenswichtige Grundlage für jegliches tierische und menschliche Leben auf der Erde. Trotzdem wurde die Verwendung von Gefäßpflanzen zum Aufspüren von Schadstoffen bisher stark gegenüber dem Einsatz von einzelligen Algen vernachlässigt. Gefäßpflanzen sind jedoch z. B. gegenüber auxinanalogen Herbiziden viel empfindlicher als einzellige Algen, da letztere nicht über eine auxingesteuerte Wachstumsregulation verfügen. Die Bewertung von Luftschadstoffen ist erst durch die quantitative Erfassung von höheren Pflanzen möglich.

Der Grund für den selteneren Einsatz von Gefäßpflanzen ist unter anderem die höhere Formenvielfalt und Komplexität von Gefäßpflanzen, welche bisher eine manuell optische und damit zeit- und kostenintensive und niemals völlig objektivierbare Auswertung erforderlich macht.

Der Pflanzen-Keimungs-Wurzellängentest z. B. nutzt die hohe Empfindlichkeit von Pflanzen gegenüber toxischen Stoffen während der Keimungsphase bis zur Ausbildung der Keimblätter aus.

Richtlinien für die Testdurchführung finden sich z. B. in:

- DIN Entwurf 38412 "Bestimmung der Wirkung von Abwasser auf das Wurzellängenwachstum der Gartenkresse". Dieser sieht ein dreitägiges beleuchtetes Wachstum von Kressesamen auf Edelstahlnetzen in eine Verdünnungsreihe von Abwasser vor. Als Meßgrößen dient die manuell gemessene Wurzellänge. Außerdem sollen Erscheinungen wie die Ausbildung der Wurzelhaarzone und Entwicklungszustand von Hypokotyl und Blättern protokolliert werden.
- Der Entwurf DIN 350 11 269 Teil 1 beschreibt die Prüfung des Wachstums vorgekeimter Gerstesamen in Bodenproben. Auch hier sollen nach 5 bis 7 Tagen und Entfernung der Erde die Länge der längsten Wurzel, gegebenenfalls auch die des Triebes gemessen werden.
- Die EPA-Richtlinie 600-3-88-029 sieht ein fünftägiges "Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites" Wachstum z. B. von Salatsamen im hell-/dunkel-Zyklus in Petrischalen in Gegenwart

der Testlösung vor. Mögliche Meßgrößen sind Keimung, Wurzellänge und Trockengewicht.

Allen Richtlinien ist gemeinsam, daß neben der zerstörenden Trockenmassebestimmung nur die einfachste Meßgröße des Wachstums – die Länge der Wurzel – bestimmt wird, da nur diese Längenmessung dem menschlichen Auge problemlos möglich ist.

Weiter bekannt sind biologische Kurzzeittests zur Wachstumshemmung/-förderung von Wasserlinsen (Lemnaceae):

Wurzelnde oder freischwimmende Gefäßpflanzen sind neben Algen ein wesentlicher Bestandteil vieler aquatischer Ökosysteme. Wasserlinsen sind eine Nahrungsquelle für Wasservögel und viele Kleintiere. Sie dienen Fischen als Futter, Deckung und Schatten. Kleine wirbellose Tiere nutzen sie als Träger. Bei zu schnellem Wachstum können sie jedoch Licht- und Sauerstoffzufuhr soweit unterbinden, daß es zu Fischsterben kommt.

Ein Test ist z. B. in der ASTM Guideline E 1415-91 "Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests With Lemna gibba G3" dargestellt. Eine vergleichbare europäische Richtlinie gibt es noch nicht. Der Test nutzt die Tatsache aus, daß sich die Schwimmblätter von Wasserlinsen bei ausreichender Temperierung, Beleuchtung und Nährstoffversorgung sehr schnell teilen. Unter toxischer Belastung kommt es jedoch zu einer Gelbfärbung vorhandener Schwimmblätter und zu einer Verringerung der Teilungsgeschwindigkeit.

Dazu müssen vor Testbeginn nach Augenmaß in alle Versuchsansätze "gleichwertige" Wasserlinsenpflanzen aus der Vorzucht aussortiert und in Gefäße mit Nährlösung eingesetzt werden. Dies ist grundlegend, da sich Startunterschiede im Verlauf des Tests weiter vergrößern und damit Schadstoffeffekte verdecken können. Gleichzeitig ist die optisch manuelle Auswahl von Pflanzen mit "gleichwertiger" Blattanzahl und Größe auch in Hinblick auf die Erfordernisse der Qualitätssicherung und Dokumentation mit einem hohen subjektiven Faktor belastet. Nach Ende der normalerweise siebentägigen Wachstumsphase im Phytotron, einer sehr gleichmäßig ausgeleuchteten Klimakammer, muß anhand einer geeigneten Meßgröße die Förderung oder Hemmung des Wachstums behandelter Versuchsansätze gegenüber unbehandelten Kontrollansätzen ermittelt werden. Die häufigste und einfachste Methode ist die Zählung der einzelnen Schwimmblätter unabhängig von deren Größe. Weitere Meßgrößen sind die Anzahl der gebildeten Wurzeln, das Trockengewicht und die Gesamtlänge aller Wurzeln. Das Trockengewicht ist der objektivste und reproduzierbarste Endpunkt, ist aber nur einmal unter Zerstörung der Wasserlinsen möglich. Der Chlorophyllgehalt ist sehr aussagekräftig für die Vitalität der Pflanzen, aber ebenfalls nur unter Zerstörung direkt meßbar.

Nachteilig bei den genannten Testverfahren ist der hohe Arbeitsaufwand, die schlecht dokumentierbaren, da subjektiven Einflußfaktoren und/oder die objektzerstörenden Maßnahmen.

Es ist demzufolge Aufgabe der vorliegenden Erfindung, unter Vermeidung der aus dem Stand der Technik bekannten Merkmale eine einfach durchzuführende, objektivierbare und objekterhaltende Möglichkeit zur Durchführung und Auswertung von Biotests zu schaffen.

Diese Aufgabe wird gelöst mit einer Vorrichtung zur Durchführung von Biotests, die Mittel zur automatischen bildanalytischen Auswertung von in Probenschalen angeordneten biologischen Proben mit und ohne Einfluß potentiell phytotoxischer Substanzen in verschiedenen Matrices und eine optische Aufnahmeeinrichtung aufweist, die die Probenschale mit Auf- oder Durchlicht beleuchtet, die Pro-

ben gegebenenfalls mit einer Glasscheibe oder einer hoch polaren Matrix planarisiert, mit einer digitalen (CCD) Kamera aufnimmt und die Daten zur Reduktion und Auswertung an ein Bildanalyse-System weitergibt.

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind Gegenstand der Unteransprüche.

So ist es bevorzugt, wenn die Vorrichtung Mittel zur automatischen Diskriminierung von Probenbestandteilen wie z. B. Samenhülle, Sproß, Wurzel, Wurzelhaare oder von Wurzelhaaren überdeckter Fläche, und zur darauffolgenden quantitativen Vermessung der Bestandteile auf z. B. Länge, Breite und Schattenfläche aufgrund der erhobenen Daten mittels Bildanalyse aufweist.

Weiter vorteilhaft sind Mittel zur Wiederauffindung individueller Proben, Probenbestandteile oder Probengruppen bei periodischen Vermessungen der gleichen Probe anhand von spezifischen Formmerkmalen und Informationen über die räumlichen Veränderungsmöglichkeiten zwischen den Messungen.

Wenn an/in den Versuchseinheiten im Sichtfeld der Kamera Barcodes angeordnet sind, die zur sicheren Zuordnung der einzelnen Messungen jeweils bildanalytisch mit ausgewertet werden und neben Informationen zum Testansatz auch Angaben über die computergenerierte Platzierung der Schale bei randomisierten Versuchen enthalten, liegt eine weitere bevorzugte Ausführungsform vor.

Es ist weiter vorteilhaft, wenn eine Einrichtung zur automatischen Kalibrierung mit einem Einheitskörper bekannter Körpergeometrie und Farbe durch automatisches Vermessen von der Bildverarbeitung vorgesehen ist. Hierdurch können in einfacher Weise die Probandaten in absolute Werte umgerechnet werden.

Besonders vorteilhaft ist es, wenn der oder die Barcodes auf dem Einheitskörper zur Kalibrierung angeordnet sind, da so der apparative Aufwand reduziert wird.

Wenn dies erforderlich sein sollte, die Bildanalyse auch ohne sichtbares Licht durchzuführen, kann eine Beleuchtungseinrichtung zum Auswerten in dunkler Testumgebung mit einem Wellenlängenbereich, der die Pflanzen in ihrem Verhalten nicht beeinflusst und bei der die CCD-Kamera arbeitet, vorgesehen werden.

Insbesondere kann dies eine Infrarotbeleuchtungseinrichtung sein.

Die in manchen Testreihen erforderliche, nach Farben getrennte Erfassung und Auswertung der Proben wird durch eine Farbkamera oder eine optische Filtereinrichtung realisiert.

Vorteilhaft ist weiter, wenn Mittel zum Vergleichen der gewonnenen Daten mit abgespeicherten Vergleichsdaten vorgesehen sind. Hierdurch kann auf im Laufe der Zeit angesammeltes Referenzdatenmaterial zurückgegriffen werden.

Wenn die Aufnahmeeinrichtungen (CCD Kamera) und die Auswerteeinrichtungen (Bildanalyse-System) räumlich getrennt sind, kann die Auswertung in vorteilhafter Weise zentral durchgeführt werden. Hierdurch muß nicht an jedem Test-/Arbeitsplatz die volle Rechenleistung vorgehalten werden.

Die CCD Kamera und die Probenschalen sollte relativ zueinander beweglich angeordnet sein, damit die CCD Kamera unterschiedliche Probenbereiche anfahren, fokussieren und aufnehmen kann.

Bevorzugt ist weiter, wenn die Auswerteeinrichtungen (Bildanalyse-System) anhand von Farb- und Strukturmustern der Testpflanzen Rückschlüsse auf die Xenobiotika (Umweltchemikalien) ziehen kann. Xenobiotika (Umweltchemikalien) verursachen bei den genannten Pflanzen verschiedene Strukturwandlungen. Die Pflanzen können sich z. B. in

Farbe, Form, Größe, Teilungsrate, Infrarotmuster oder Chlorophyllgehalt verändern. Es kann vollständiger und partieller Pigmentverlust auftreten. Es kommt zu Kolonien-aufbruch, zur Buckelbildung, zum Verlust oder zur extremen Bildung von Wurzelhaaren. Wasserläusen können Antozyanen auf der Unterseite bilden, oder sie bilden Turione. All diese Merkmale können Rückschlüsse auf vorhandene Xenobiotika zu lassen. Die meisten Merkmale sind jedoch nach heutigem Stand der Technik nur durch Zerstörung des Organismus zu bestimmen. Dadurch können immer nur einzelne Merkmale untersucht werden, und die spezifische Aussagekraft der Messung ist nicht gegeben. Durch die integrale Erfassung aller Merkmale, kann die Auswerteeinrichtung Rückschlüsse auf die vorliegenden Xenobiotika machen. Dabei werden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen erkennt die Auswerteeinrichtung vorgegebene Merkmalsmuster, zum anderen werden durch eine Vielzahl von Tests neue Merkmalsverknüpfungen von der Auswerteeinrichtung selbständig gefunden.

Ein weiteres vorteilhaftes Merkmal der Erfindung ist es, daß die Auswerteeinrichtungen (Bildanalyse-System) die Keimlinge aufgrund von Bewegungsmustern, Farb- und Formenklassen auch nach deren Aufwachsen wiederfinden kann. In Keimungs- und Aufwuchstest werden eine Vielzahl gleicher Pflanzen in einem Versuchsgefäß beobachtet. Durch die enorme Ähnlichkeit ist es bisher nicht möglich, einzelne Organismen wieder aufzufinden und sie eindeutig über längere Zeit zu identifizieren. Die Aufnahmeeinheit kann z. B. bis zu 100 Keimlinge gleichzeitig beobachten, und sie aufgrund der beschriebenen Merkmalsmuster einwandfrei zuordnen. Hinzu kommt die Möglichkeit der Wiedererkennung aufgrund von vorgegebenen Bewegungsmustern.

Objekte, die unter der Grenze der Auflösungsgröße der CCD-Kamera liegen (kleiner 1 mm), sollten bevorzugt originalgetreu wiedergegeben werden. Die normale Auflösungsgrenze von CCD Kameras mit einer Auflösung von 520 · 520 Pixeln liegt bei einem untersuchten Feld von 100 × 100 mm bei ca. 3 mm² (520 Pixel a 3 Farben entsprechen 174 Pixel pro Farbe. Um ein Objekt klar darzustellen braucht man jedoch mindestens 3 · 3 Pixel). Da die Objekte bekannt sind, kann die Auswerteeinheit gefundene Objekte an bekannte Muster anfitzen, und so die Auflösung erhöhen. Die Objekte werden dann nicht mehr als Pixel Matrix dargestellt, sondern als mathematische Funktion. Dadurch ist es möglich, die eigentlich beschränkte Auflösung der Kamera zu steigern und auch Objekte, die kleiner als 3 mm² sind, maßstabsgetreu darzustellen.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform liegt vor, wenn die Aufnahmeeinrichtung (CCD-Kamera) und die Auswerteeinrichtung durch Filtersysteme die Stoffwechselrate der Pflanze anhand von Infrarotmustern bestimmen kann. Ein wichtiges Merkmal für die Fitneß von Pflanzen ist deren Stoffwechselrate. Sowohl die Photosyntheseleistung, als auch die Oxidation von Stärke und Fetten verändern das Infrarotmuster durch Reflexion und eigener Emission von Pflanzen. Diese Veränderungen können mittels IR-Filtern durch die CCD Kamera sichtbar gemacht werden. Die Auswerteeinheit paßt die Filtersysteme selbständig an, und kann somit zwischen Photosynthesestoffwechsel und Atmung unterscheiden. Diese Merkmalsmuster konnten bisher nicht zerstörungsfrei und über längere Zeit erfaßt werden, da die IR-Spektren nicht von dem normalen Grundrauschen zu unterscheiden waren. Durch spezielle Beleuchtung und Kühlung lassen sich nun auch feinste Unterschiede feststellen.

Schließlich ist es vorteilhaft, wenn spezifische optische Filter für Beleuchtung und Kamera zur Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Pflanzen vorgesehen sind.

Bisher werden derartige Fluoreszenzsignale integral über die gesamte Bildfläche ausgewertet. Neuartig ist, daß derartige Fluoreszenzsignale mit morphologischen Filtern bearbeitet werden. Weiterhin werden die Bilddaten mit den Daten und Formen der Bildobjekte im sichtbaren und IR-Bereich überlagert und gemeinsam ausgewertet. Diese Anwendung eignet sich besonders für Kurzzeittests im Stundenbereich.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung (vgl. Fig. 1) zeichnet sich bei vollständiger Kompatibilität mit den vorhandenen Testrichtlinien durch eine Vermeidung der oben genannten Probleme bei gleichzeitiger Schaffung neuer, empfindlicher Meßgrößen aus. Durch die automatische Bildanalyse werden subjektive Faktoren ausgeschlossen, der notwendige Personalaufwand drastisch reduziert. Damit werden Mehrfachmessungen problemlos möglich und eine valide, kontinuierliche Dokumentierbarkeit geschaffen.

Die eigentliche Auswertung wird nur durch die verwendete Software eingeschränkt. So ist es z. B. möglich, mit den gewonnenen Daten folgende Untersuchungen durchzuführen:

- Erkennung von Nekrosen, Chlorosen und Blattmißbildungen;
- Unterscheidung von toten und lebenden Blättern;
- Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit und Keimungsrate und andere kontinuierliche oder engmaschige Bestimmungen von Parametern (z. B. Teilungsrate, Flächenzunahme, Chlorophyllentwicklung, Wachstumsgeschwindigkeit, Absterbedynamik), die von Hand wegen des hohen Zeitaufwands kaum (wirtschaftlich) möglich sind;
- Bestimmung der Blattanzahl;
- Bestimmung der Frondzahl;
- Bestimmung von Gesamt- und Einzelfrondfläche;
- Bestimmung von Gesamt- und Einzelgrünheit;
- Bestimmung des Chlorophyllgehaltes über die Grünheit der Blätter
- Bestimmung des Trockengewichts über Volumenanalyse und Flächenanalyse;
- Bestimmung von Effektkonzentrationen (EC_{50});
- Bestimmung von Blattgrößen, Blattgrößenverteilungen und Blattformen;
- Gesamterfassung einer höheren Pflanze;
- automatischer Vergleich zu unbelasteten sogenannten Nullkontrollen, sowohl aus parallelen Versuchssätzen als auch aus gespeicherten Datensätzen;
- Erfassung von IR-Mustern und Überlagerung mit sichtbaren morphologischen Strukturen;
- Archivierung der bildanalytischen Daten z. B. für eventuelle spätere Zweitgutachten.

Dabei ist es insbesondere möglich, die gewonnenen Daten mittels Datenfernübertragung an eine zentrale Analyseeinrichtung zu übermitteln, dort z. B. durch Vergleich mit großen Beständen an Standarddaten auswerten zu lassen und die Auswertung zurückzuübermitteln.

Die in den beiden Fig. 1 und 2 dargestellten Vorrichtungen sind lediglich Ausführungsbeispiele der Erfindung.

In Fig. 1 ist eine Ausführungsform dargestellt, bei der die in einer Probenschale od. dgl. befindliche Probe auf einem Objektisch angeordnet wird. Je nach Fragestellung erfolgt entweder keine Beleuchtung oder eine Beleuchtung von den neben der Kamera angeordneten Beleuchtungseinrichtungen als Aufsicht oder von der unterhalb des Objektisches angeordneten Beleuchtungseinrichtung als Durchlicht. Die Kamera, z. B. eine CCD Kamera nimmt die Bilder auf, die dann mittels einer Auswerteeinheit, vorzugsweise in Form

eines PCs bildanalytisch verarbeitet werden. Die Daten werden auf einem Monitor dargestellt.

In Fig. 2 ist eine alternative Ausführungsform gezeigt, bei der die Kamera oberhalb einer Klimakammer mit mehreren Proben verfahrbar angeordnet ist. Die Kamera kann so in vorgegebenen zeitlichen Abständen die einzelnen Proben anfahren und entsprechende Aufnahmen wie vorbeschrieben machen.

Nachstehend werden noch zwei Anwendungsbeispiele für die erfindungsgemäße Vorrichtung erläutert.

Anwendungsbeispiel Wurzellängentest

Die erfindungsgemäße computergestützte Bildanalyse erfaßt jeden Keimling einzeln. Mit bildanalytischen Methoden werden dann Samenhülle, Sproß und Wurzel, gegebenenfalls auch Wurzelhaare separiert und dann getrennt quantifiziert. Mögliche Meßgrößen sind z. B. Samenquellung, Keimung (Wurzel nach bestimmter Inkubationszeit länger als 1-4 mm), Wurzellänge, Wurzelschattenfläche, mittlerer Wurzeldurchmesser, Verhältnis der Wurzellänge zum Durchmesser, von den Wurzelhaaren bedeckte Fläche, Sproßlänge, Sproßfläche und Blattfläche.

Dies erlaubt es, ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand auch bisher nur schlecht feststellbare Effekte wie eine Veränderung der Wurzelstärke oder Blattfläche unter Schadstoffeinfluß zu erkennen.

Die erst durch die Automatisierung praktikable periodische Vermessung aller Proben bei Petrischalentests während der Keim- und Wachstumsphase ermöglicht die Bestimmung zeitlicher Wachstumsparameter wie Keimungszeitpunkt und individuelle Wachstumskurven. Dies ermöglicht auch eine automatische Separierung von ungekeimten Samen und solchen, die in der Keimungs- oder ersten Wachstumsphase abgestorben sind. Zur individuellen Wiederauffindung der sich auf dem Untergrund bewegenden Keimlinge werden bei jeder Messung die räumliche Lage spezifischer Keimlingsmerkmale der einzelnen Keimlinge bildanalytisch ermittelt und mit abgespeichert. Diese Merkmale ermöglichen bei der nächsten Messung die individuelle Zuordnung von Keimlingen.

Die Auswertung des Versuchs erfolgt beim Test in Petrischalen entweder durch Herausnehmen der Schalen aus dem Inkubationsraum (gegebenenfalls Phytotron) in die Meßvorrichtung oder durch Einbau der Kamera in einen horizontal beweglichen Schlitten im Inkubationsraum. Dies gestattet vollautomatische Mehrfachmessungen und die Messung und Versuchsauswertung an arbeitsfreien Tagen.

Bei anderen Testvorschriften werden die Pflanzen von der Aufwuchsmatrix manuell befreit und anschließend bildanalytisch vermessen.

Zur Planarisierung kann eine Glasscheibe auf die Keimlinge/Pflanzen gelegt werden.

Alle Rohdaten können direkt statistisch ausgewertet werden.

Um Verwechslungen auszuschließen, kann an/in jedem Gefäß/Versuchsansatz im Sichtfeld der Kamera ein Barcode angebracht werden, der bei der Bildanalyse jeweils mit eingelesen wird. Er enthält neben Informationen zum Testansatz auch Angaben über die computergenerierte Platzierung der Schale bei randomisierten Versuchen.

Die Beleuchtung wird in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Pflanze als Durchlicht oder Aufsicht ausgeführt. Ein spezieller Fall stellt die Infrarotbeleuchtung dar. Mit Infrarotbeleuchtung können die Keimlinge kontrolliert werden, ohne ihr Wachstum zu beeinflussen, da Infrarotlicht keine Auswirkungen auf die Photosynthese der Pflanzen hat. Andererseits ist die CCD Kamera dagegen empfindlich

für Infrarotlicht.

Für eine automatische Kalibrierung der Meßgröße kann ein definierter Körper in die Schale eingebracht werden. Die Pixelwerte und deren Farbwerte, die von der Bildverarbeitung aufgenommen werden, können so in absolute Meßgrößen umgewandelt werden. Dies ermöglicht einen Vergleich mit manuellen Auswertungen.

Anwendungsbeispiel Wasserlinsentest

Die computergestützte Bildanalyse erfaßt jedes Blatt der Wasserlinsen im Testgefäß einzeln, stellt die Fläche fest und ermöglicht damit über die Anzahl hinaus Größenverteilungen und Gesamtfläche darzustellen. Dies erlaubt auch bisher nur schlecht feststellbare Effekte, wie eine Verkleinerung der Schwimmblätter unter Schadstoffeinfluß, zu erkennen.

Die Auswertung des Versuchs erfolgt entweder durch Herausnehmen der Schalen aus dem Phytotron und Platzierung in die Meßvorrichtung oder auch durch Einbau der Kamera auf einem beweglichen Schlitten im Phytotron selbst bzw. der Probe. Dies gestattet vollautomatische Mehrfachmessungen und die Messung und die Versuchsauswertung an arbeitsfreien Tagen.

Die Beleuchtung für die Messung erfolgt von oben mit einer zusätzlichen Beleuchtung rund um die Kamera, wobei ggf. das Licht des Phytotrons abgeschirmt wird. Zur besseren Unterscheidung von grünen, gelben und "weißen" Blättchen wird eine Farbkamera oder eine Graustufen-Kamera mit beweglichen Filtern verwendet und gegebenenfalls auch mit Durchlicht gearbeitet. Die Bestimmung der Summe aller Schwimmblätter erfolgt nach Abschaltung der Zusatzbeleuchtung ohne Filter. Bei direkten Messungen im Phytotron wird die Zusatzbeleuchtung abgeschaltet, so daß eine quasi indirekte Beleuchtung/Durchlicht vorliegt.

Zur Dokumentation der jeweiligen Startbedingungen in jedem Versuchsgefäß werden vor Versuchsbeginn alle einzusetzenden Wasserlinsengruppen mit der Bildanalyse vermessen und Gruppen, die enge Qualitätsanforderungen an die Homogenität nicht einhalten, aussortiert. Dies verringert mögliche Standardabweichungen erheblich und schafft eine Testhomogenität, die mit dem menschlichen Auge alleine nicht erreichbar wäre.

Während des laufenden Versuches können gegebenenfalls in definierten Abständen ohne großen Aufwand Messungen durchgeführt und zeitliche Verschiebungen in der Wachstumsdynamik dokumentiert werden.

Für die Endauswertung, die statistischer Auswertung der Rohdaten und die Kennzeichnung mittels Barcodes gelten die vorstehenden Ausführungen analog.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Durchführung von Biotests, **gekennzeichnet durch** Mittel zur automatischen bildanalytischen Auswertung von in Probenschalen angeordneten biologischen Proben mit und ohne Einfluß potentiell phytotoxischer Substanzen in verschiedenen Matrices, mit einer optische Aufnahmeeinrichtung, die die Probenschale mit Auf- oder Durchlicht beleuchtet, die Proben gegebenenfalls mit einer Glasscheibe oder einer hoch polaren Matrix planarisiert, mit einer digitalen (CCD) Kamera aufnimmt und die Daten zur Reduktion und Auswertung an ein Bildanalysesystem weitergibt.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Mittel zur automatischen Diskriminierung von Probenbestandteilen wie z. B. Samenhülle, Sproß, Wurzel, Wurzelhaare oder von Wurzelhaaren über-

deckter Fläche, und zur darauffolgenden quantitativen Vermessung der Bestandteile auf z. B. Länge, Breite und Schattenfläche aufgrund der erhobenen Daten mittels Bildanalyse.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch Mittel zur Wiederauffindung individueller Proben, Probenbestandteile oder Probengruppen bei periodischen Vermessungen der gleichen Probe anhand von spezifischen Formmerkmalen und Informationen über die räumlichen Veränderungsmöglichkeiten zwischen den Messungen.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet durch an/in den Versuchseinheiten im Sichtfeld der Kamera angeordneten Barcodes, die zur sicheren Zuordnung der einzelnen Messungen jeweils bildanalytisch mit ausgewertet werden und neben Informationen zum Testansatz auch Angaben über die computergenerierte Platzierung der Schale bei randomisierten Versuchen enthalten.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch eine Einrichtung zur automatischen Kalibrierung mit einem Einheitskörper bekannter Körpergeometrie und Farbe durch automatisches Vermessen von der Bildverarbeitung, so daß die Probandaten in absolute Werte umgerechnet werden können.

6. Vorrichtung nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß der oder die Barcodes auf dem Einheitskörper zur Kalibrierung angeordnet sind.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, gekennzeichnet durch eine Beleuchtungseinrichtung zum Auswerten in dunkler Testumgebung mit einem Wellenlängenbereich, der die Pflanzen in ihrem Verhalten nicht beeinflußt und bei der die CCD-Kamera arbeitet, so daß die Bildanalyse auch ohne sichtbares Licht durchgeführt werden kann.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Beleuchtungseinrichtung als Infrarotbeleuchtungseinrichtung ausgebildet ist.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gekennzeichnet durch eine Farbkamera oder eine optische Filtereinrichtung zur nach Farben getrennten Erfassung und Auswertung der Proben.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, gekennzeichnet durch Mittel zum Vergleichen der gewonnenen Daten mit abgespeicherten Vergleichsdaten.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufnahmeeinrichtungen (CCD Kamera) und die Auswerteeinrichtungen (Bildanalysesystem) räumlich getrennt sind, so daß die Auswertung zentral durchgeführt wird.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die CCD Kamera und die Probenschalen relativ zueinander beweglich angeordnet sind, so daß die CCD Kamera unterschiedliche Probenbereiche anfahren, fokussieren und aufnehmen kann.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Auswerteeinrichtungen (Bildanalysesystem) anhand von Farb- und Strukturmustern der Testpflanzen Rückschlüsse auf die Xenobiotika (Umweltchemikalien) ziehen kann.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Auswerteeinrichtungen (Bildanalysesystem) die Keimlinge aufgrund von Bewegungsmustern, Farb- und Formenklassen auch nach deren Aufwachsen wiederfinden kann.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14,

dadurch gekennzeichnet, daß Objekte, die unter der Grenze der Auflösungsgröße der CCD-Kamera liegen (kleiner 1 mm), originalgetreu wiedergegeben werden.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufnahmeeinrichtung (CCD-Kamera) und die Auswerteeinrichtung durch Filtersysteme die Stoffwechselrate der Pflanze anhand von Infrarotmustern bestimmen kann.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß spezifische optische Filter für Beleuchtung und Kamera zur Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Pflanzen vorgesehen sind.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

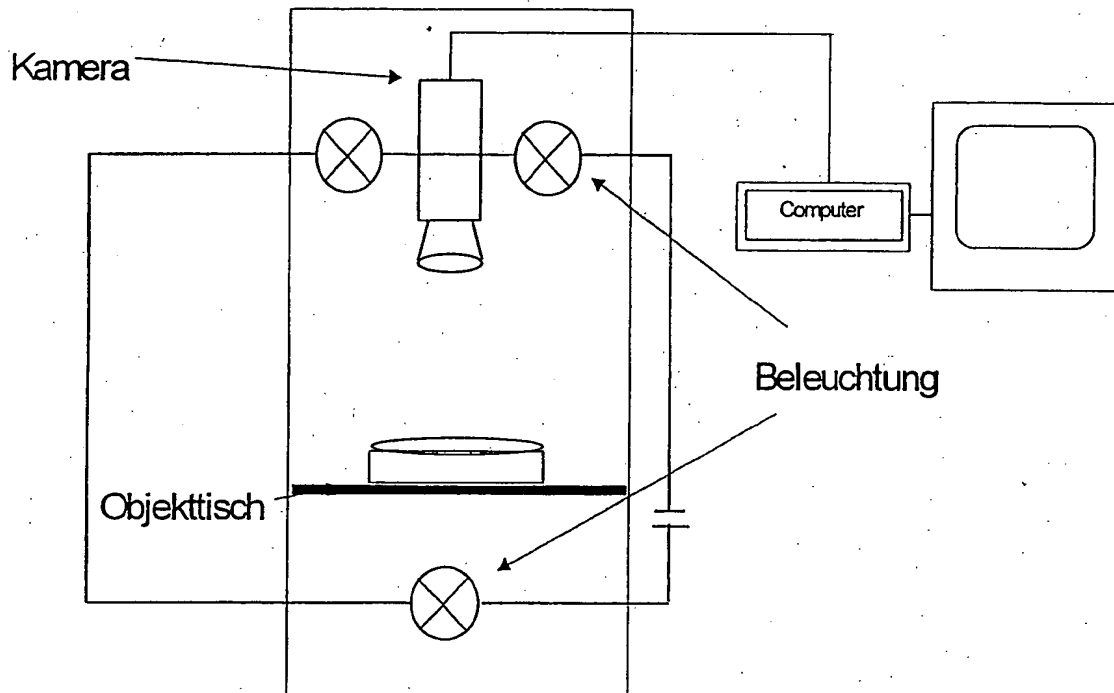
45

50

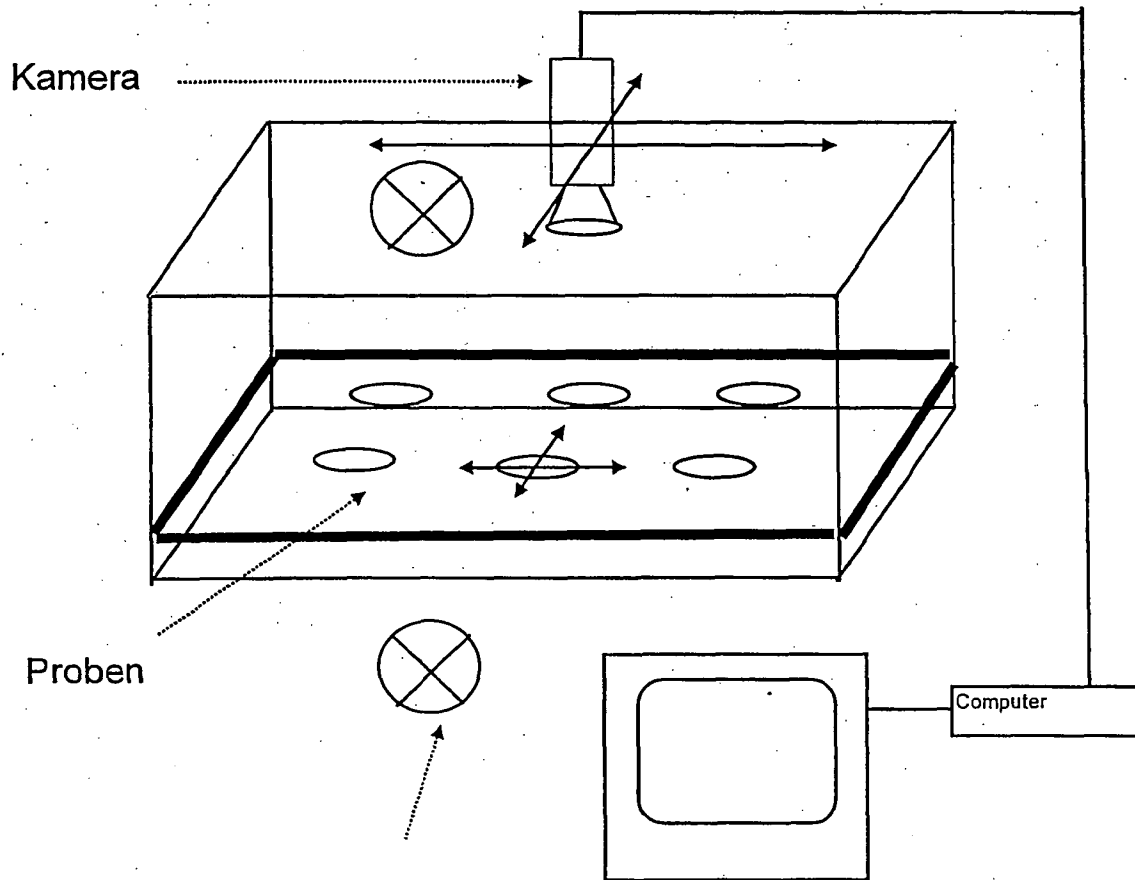
55

60

65



Figur 1



Figur 2